

THESIS

MÜNCH

1965

DAS LACTATDEHYDROGENASE-ERHÖHENDE
VIRUS AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN
(RILEY-VIRUS)

II. VERSUCHE ZUR VIRUSVERMEHRUNG IN
VERSCHIEDENEN ZELLKULTUREN

Ingeborg Lenz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154008_0137

DAS LACTATDEHYDROGENASE-ERHÖHENDE
VIRUS AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN
(RILEY-VIRUS)

II. VERSUCHE ZUR VIRUSVERMEHRUNG IN
VERSCHIEDENEN ZELLKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingeborg Lenz
aus Bamberg

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Professor Dr. O. HUG
Berichterstatter:	Dr. A. GEORGII
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1965

MEINEN ELTERN
GEWIDMET

I N H A L T

	Seite
1. Einleitung	7
2. Material und Methode; Grundsätzliche Angaben für alle durchgeführten Experimente	8
3. Nachweis von LDH-Virus im Mäuse-Lymphom Nemeth-Kellner (Versuch 70)	10
4. Verhalten des LDH-Virus auf Milzkulturen (Versuch 270/271)	12
5. Vergleich der Autolyse des LDH-Virus in vitro mit seiner Inkubation in Mäuseembryonalkulturen (MEK) (Versuch 107)	14
6. Verhalten des LDH-Virus in Mäuseembryonalkulturen unter Nährmedien unterschiedlicher Zusammensetzung (Versuch 126)	16
7. Gewebekulturen nach diaplacentarer Infektion von Mäuseembryonen mit dem LDH-Virus und Entnahme der Embryonen für die Kulturen zu verschiedenen Zeiten (Versuch 95, 124 und 139)	19
8. Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse	26
Schrifttumsverzeichnis	29
Lebenslauf	33

Die Untersuchungen wurden mit Sachbeihilfe und mit Geräten der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt (Ge 121/2 und 121/3).

1. EINLEITUNG

Von RILEY et al. wurde in vielen Transplantationsgeschwülsten der Maus ein Agens nachgewiesen, das im Serum von infizierten Mäusen einen lebenslang anhaltenden Anstieg des Fermentes Lactatdehydrogenase bewirkt (26). Dieses Agens ist bei infizierten Mäusen in allen Organen enthalten und durch zellfreie Filtrate auf andere Mäuse übertragbar.

RILEY et al. fanden das LDH-Agens inzwischen in 30 verschiedenen Geschwülsten der Maus und wurden in ihren Ergebnissen bestätigt (ADAMS et al., 1; CRISPENS, 7; GEORGII et al., 9-14; MUNDY u. WILLIAMS, 19; NOTKINS et al., 20). Im Pathologischen Institut der Universität München wurde von GEORGII 1962 (13) im Landschütz-Ascitessarkom I und in virusinduzierten Leukämien der Maus (9, 14) ein LDH-Agens gefunden. GEORGII et al. untersuchten 1962 einen weiteren neuen Tumor der Maus, das Ascites-Lymphom von NEMETH u. KELLNER auf seinen Gehalt an LDH-Agens (11).

Eine wesentliche Eigenschaft des LDH-Agens ist seine Vermehrung in vivo durch fortlaufende Tierpassagen (GEORGII et al., 11; MUNDY u. WILLIAMS, 19; RAUEN u. HUPE, 23; RILEY et al., 26; ZOBL, 33).

Für weitere Untersuchungen mit LDH-Virus, besonders über seine Viruseigenschaften, ist die Adaptation und die Vermehrung des Virus in Gewebekulturen wichtig. Hierzu liegen für einander widersprechende Literaturangaben vor. YAFFE (32) gibt an, daß das LDH-Virus fortlaufend und unbegrenzt in Gewebekulturen vermehrt werden kann. Diese Angabe wird auch von PLAGEMANN u. SWIM (22) sowie von RILEY (24) bestätigt. ADAMS et al. (1) und ROWSON et al. (28) sowie TENNANT u. WARD (30) stellten demgegenüber fest, daß das LDH-Virus bei Passagen in Gewebekulturen verloren geht, und die Züchtung von Riley-Virus tragenden Tumoren in vitro geradezu ein Verfahren zur Entfernung des Virus sei.

Unsere vorgelegten Untersuchungen beschäftigten sich deshalb mit dem Verhalten des LDH-Virus in verschiedenartigen Zellkulturen, mit der Beeinflussung durch unterschiedliches Medium für die Kulturen und mit verschiedenartiger Infektion der Kulturzellen durch das Virus.

2. MATERIAL UND METHODE

Ausgangsgewebe für das LDH-Virus:

A) Mäusesarkom Sa 1 (Landschütz). Es wurde 1956 von GRAFFI übernommen und seit dieser Zeit in wöchentlichen Transplantationspassagen zunächst auf eigenen AB-Inzuchtmäusen und später auf nicht ingezüchteten Mäusen des Stammes NMRI aus dem Institut für Versuchstierzucht Hannover in Ascitesform gehalten.

B) Das Asciteslymphom von NEMETH und KELLNER wurde 1962 von Dr. Nemeth, Budapest, übernommen und in gleicher Weise wie das Mäusesarkom Sa 1 auf NMRI-Mäusen gehalten.

Beide Tumoren wurden auf ihren Gehalt an LDH-Virus untersucht.

Herstellung der Viruslösungen:

Beide Tumoren wurden in üblicher Weise als Transplantationstumoren gehalten. Beim N K-Lymphom war es notwendig, bei der Entnahme den Ascites mit Hanks'scher Lösung zu verdünnen, um frühzeitig eintretende Hämorrhagien des wachsenden Tumors zu vermeiden.

Für die Viruslösungen wurde am 9. Tag nach der Transplantation der Ascites steril entnommen; der von mehreren Tieren gewonnene Ascites wurde im Verhältnis 1:4 mit Hanks'scher Salzlösung verdünnt und bei 20 000 - 30 000 Umdrehungen im Messerhomogenisator 15 Minuten lang homogenisiert. Das Homogenat wurde dann bei 2 - 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde unter Stickstoffdruck durch Seitz-E K-Filter gepreßt. Zur Sterilitätskontrolle wurden Merck-Boullionkulturen mit Proben des Filtrats beimpft. Das so gewonnene Material war die Ausgangslösung des vermuteten LDH-Virus. Die sterilen Impflösungen wurden bis zur Verwendung im Tierversuch bei -24°C eingefroren.

Nachweis des LDH-Virus:

Das sterile, zellfreie Filtrat wurde durch intraperitoneale Injektion von je 0,4 ml auf Gruppen von je 4 bis 6 NMRI-Mäusen übertragen. Die Tiere wurden bis zu 60 Tagen beobachtet. Während dieser Zeit wurde mehrmals die Serum-LDH gemessen. Ein Anstieg der Serum-LDH auf fünffache Normwerte, d.h. von 20 auf über 100 Bücher-Einheiten wurde als positive Virusinfektion gewertet.

Bestimmung der Infektiosität des LDH-Virus:

Mit frisch entnommenem Ascitestumor und Hanks'scher Lösung wurde eine einfache geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Die einzelnen Verdünnungen wurden im Tierversuch auf ihren Gehalt an LDH-Virus untersucht. Der so ermittelte infektiöse Titer der Viruslösung betrug 8×10^3 .

Serumgewinnung und Fermentaktivitätsmessung:

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Glaskapillaren nach der von RILEY (23a) angegebenen Methode. Pro Maus wurden etwa 0,25 ml Blut entnommen. Die Kapillaren wurden unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert. Dabei wurde je 0,05 ml Serum gewonnen. Das Serum wurde bis zur Fermentbestimmung bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Das Serumferment LDH wurde im optischen Test nach Warburg bei 366 m μ im Eppendorff-Photometer gemessen. Als Reagentien wurden die Puffer-Pyruvat-Substrate und DPNH der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim, verwendet. Die Reaktion wurde eine Minute lang automatisch registriert, die Fermenterhöhung in Einheiten nach Bücher berechnet.

Gewebekulturen:

a) Mäuseembryonalkulturen (MEK):

Es wurden einschichtige Suspensionskulturen von Mäuseembryonalzellen verwendet. Die Embryonen trächtiger NMRI-Mäuse wurden steril entnommen, mit der Schere zerkleinert und mehrfach trypsiniert. Die Kulturen wurden in Vierkantflaschen von 200 ml Inhalt angesetzt. Jede Flasche wurde mit 10 ml zellhaltigem Nährmedium beschickt. Der einschichtige Zellbelag bildete sich am 2. Tag. Am 3. und 4. Tag wurde das Nährmedium erneuert. Vom 4. Tag an konnten die Primärkulturen durch Trypsinisieren abgelöst und geteilt werden.

Virusbeimpfung:

Hierzu wurden Zweit- und Drittkulturen verwendet. Das Nährmedium bestand aus Hanks'scher Salzlösung, inaktiviertem Kälberserum und Hühnerembryonalextrakt im Mischungsverhältnis 7:2:1. Jedem Milliliter Nährmedium wurden 2500 E Penicillin und 10 mg Streptomycin zugesetzt. Jede MEK wurde mit 0,5 ml virushaltigem Tumorfiltrat beimpft und dann in üblicher Weise bei 37° inkubiert.

b) Milzkulturen:

Die Milz von gesunden NMRI-Mäusen wurde in kleingeschnittenen Stücken zu Kulturen verwendet. Die Kulturen wurden als Rollerkulturen in Reagenzgläsern mit einer Umlaufgeschwindigkeit von 5 U/min angesetzt und bei 37° inkubiert.

Pro Kultur wurden 2,5 ml Medium der oben angegebenen Zusammensetzung und 0,5 ml virushaltiges Filtrat aus Mäusesarkom Sa I angesetzt. Das Nährmedium der Milzkulturen wurde mehrmals erneuert und zwar nach 3, 5, 8 und 11-tägiger Inkubationsdauer.

Das abgezogene infizierte Kulturmedium wurde bei -24°C bis zur Verwendung im Tierversuch eingefroren.

Von dieser allgemeinen Methode abweichende Versuchsv Verfahren werden bei den einzelnen Versuchen erwähnt.

3. NACHWEIS VON LDH-VIRUS IM MÄUSE-LYMPHOM NEMETH-KELLNER (Versuch 70)

Zunächst wurde die Serumfermentänderung der LDH von Mäusen mit dem Transplantationstumor N K-Lymphom untersucht. Dann wurde versucht, in diesem Tumor durch zellfreie Übertragung ein LDH-Virus nachzuweisen und die zellfreie virushaltige Lösung des Lymphoms mit einer gleichen aus dem Landschütz-Ascites-sarkom Sa I verglichen.

Ergebnisse:

Nach zellulärer Übertragung des verdünnten Lymphom-Ascites wurde bereits 48 Stunden später eine deutliche Erhöhung der Serum-LDH (über 150 BücherE) beobachtet. Bis zum 8. Versuchstag stieg die LDH fortlaufend an; siehe Tabelle 1.

Am 8. Tage nach Transplantation des Tumors betrug der Mittelwert der Serum-LDH-Einheiten über 400. Zu dieser Zeit verendeten die ersten Tiere. Bei der Sektion der Tumortiere wurde regelmäßig eine starke Vergrößerung von Leber und Milz beobachtet.

Durch Übertragung von zellfreiem Filtrat aus dem Ascitestumor auf normale Mäuse wurde ein starker anhaltender Anstieg der Serum-LDH ausgelöst. Die stärkste Fermenterhöhung wurde am 4. Tag p. i. mit durchschnittlich 263 Bü.E. gemessen. Es erfolgte dann ein langsamer Abfall der LDH; beim Abbruch des Versuches am 53. Tag bestand noch eine 6-fache Erhöhung gegenüber der Norm.

Zellfreies Filtrat aus Mauseascitestumor Sarkom I verursachte gleichfalls eine Serum-LDH-Erhöhung. Diese Ergebnisse sind mit dem LDH-Virus aus N K-Lymphom vergleichbar.

Die Wirkung von Landschütz-Sarkom-Filtrat entspricht der früher in anderen Versuchen gefundenen LDH-Erhöhung (GEORGII et al., 1963, 11).

Diskussion:

Die Ergebnisse machen die Anwesenheit eines fermentbeeinflussenden Virus wahrscheinlich und stimmen mit früheren Ergebnissen überein (GEORGII et al., 11).

Dies gilt ebenso für den zellulär übertragenen Ascitestumor N K-Lymphom, wie für die Infektion durch zellfreie Homogenate aus N K-Lymphom oder Landschütz-Sarkom.

Vor allem die Möglichkeit einer zellfreien Übertragung auf unbehandelte Mäuse und die danach eintretende ständige LDH-Erhöhung berechtigt, ein LDH-Virus im Tumor anzunehmen. Dies ist deshalb hervorzuheben, weil rasch wachsendes, von Nekrosen durchsetztes Tumorgewebe mit einiger Regelmäßigkeit im Experiment wie auch in der menschlichen Pathologie zu Erhöhungen der Serum-LDH führt (WARBURG u. CHRISTIAN, 31; BIERMANN et al., 14; BODANSKY, 15;

SCHWARTZ et al., 29; WU u. SUNG, 16; RILEY u. WROBLEWSKI, 27; CRISPENS, 7; HILL u. LEVI, 17 u. v. a.). So kann auch erklärt werden, daß der Fermentanstieg bei den Tumortieren rasch und fortlaufend parallel dem Tumorstadium erfolgte und in wenigen Tagen sehr hohe Werte erreichte. Im Gegensatz dazu war der Anstieg bei Übertragung von zellfreiem Filtrat geringer und sank im Laufe des Versuches etwas ab.

Es ist zu bemerken, daß nach Infektion mit dem LDH-Virus aus N K-Lymphom ein rascher eintretender und höher ansteigender LDH-Effekt erfolgt als nach Infektion mit dem LDH-Virus aus Landschütz-Sarkom. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, besonders gleicher Herstellung der Viruslösungen aus beiden Tumoren, liegt die Vermutung nahe, diesen Effekt auf eine unterschiedliche Infektiosität oder sogar auf zwei verschiedene Virusarten zurückzuführen. Eine unterschiedliche Virusaktivität bzw. ein unterschiedlicher Virusgehalt könnte infolge besserer Vermehrung in den Wirtszellen des N K-Lymphom verstanden werden.

Unsere Ergebnisse können diese Fragen nur anschneiden, ohne sie im Rahmen der vorliegenden Versuche beantworten zu können.

Form der Virusübertragung	Versuchstage / LDH-Aktivität Bü.E.							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
1. Serumfermentänderung im Transplantationstumor N K-Lymphom	44	173	230	143	232	270	295	443
2. Zellfreie Übertragung eines Homogenates des N K-Lymphom zum Nachweis des LDH-Virus	4.	14.	26.	37.	53.			
	263	203	190	185	182			
3. Zellfreie Übertragung eines Homogenates des Sa I-Ascites-Tumor zum Nachweis des LDH-Virus	4.	14.	26.	37.				
	111	143	132	123				

TABELLE 1: Fortlaufende Untersuchung des Serumfermentes LDH in Mittelwerten von mehreren Mäusen einer Gruppe an verschiedenen Versuchstagen nach Infektion mit LDH-Virus verschiedener Abkunft.

4. VERHALTEN VON LDH-VIRUS AUF MILZKULTUREN (Versuch 270/271)

Auf der Suche nach geeigneten Wirtszellen für das LDH-Virus wurde seine Vermehrung durch Inkubation auf Milz-Stückchenkulturen versucht. Hierzu wurden zwei getrennte Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die genaue Ausführung der Versuche wurde im Teil "Material und Methode" beschrieben. Der Virusnachweis wurde an zwei Gruppen von je 5 NMRI-Mäusen durchgeführt.

Als Kontrollversuch wurde anderen Tiergruppen virusfreie Kulturflüssigkeit injiziert. Die Serum-LDH wurde wie früher angegeben mehrmals gemessen.

Ergebnisse:

Beide Versuche zeigten etwas unterschiedliche Ergebnisse.

In Versuch 270 konnte aktives LDH-Virus bis zu einer Inkubationsdauer von 8 Tagen in Milzkulturen nachgewiesen werden. Sowohl das erste nach drei Tagen entnommene als auch das dritte nach acht Tagen entnommene Kulturmedium enthielt aktives LDH-Virus, wie die deutlich gesteigerte Fermenterhöhung im Tierversuch zeigte. Nach 11-tägiger Inkubation enthielt das Kulturmedium kein im Tierversuch nachweisbares LDH-Virus mehr.

In den Kontrollversuchen blieben virusfreie Kulturmedien im Tierversuch wirkungslos.

Im Parallelversuch 271 war eine Aktivität von LDH-Virus nur bis zum 3. Inkubationstag eindeutig nachweisbar. Nach der dritten Erneuerung des Kulturmediums am 8. Inkubationstag war kein aktives Virus mehr enthalten. Die fermentsteigernde Wirkung des LDH-Virus bei diesem Versuch (271) war in allen untersuchten Inkubationszeiten geringer als beim vorhergegangenen (270).

Das LDH-Virus konnte also auf Milzkulturen nur bis zu 8 Tagen aktiv erhalten werden.

Inkubationszeit	Versuch 270	Versuch 271
3 Tage	positiv	positiv
8 Tage	positiv	(positiv)
11 Tage	negativ	negativ

TABELLE 2: Verhalten der Serum-LDH-Erhöhung im Tierversuch nach Inkubation des LDH-Virus in Milzkulturen.

Diskussion:

Durch den notwendigen Wechsel des Kulturmediums tritt eine Verdünnung der Virusmenge ein. Versucht man, die dadurch erfolgenden Verdünnungen nach den einzelnen Mediumwechseln überschlägig für unsere Versuchsanordnung zu berechnen, so ergibt sich

für das	1.	Medium	eine	Konzentration	des	Virus	von	10^{-1}
"	"	2.	"	"	"	"	"	10^{-2}
"	"	3.	"	"	"	"	"	10^{-3}
"	"	4.	"	"	"	"	"	10^{-4}

Bei einer Verdünnung des LDH-Virus von 10^{-3} war seine Wirkung bei Mäusen bereits unterschiedlich. In einem Versuch (270) war sie noch voll erhalten, bei einem anderen jedoch (271) deutlich geschwächt. Man darf also diesen Verdünnungsgrad als äußerste Infektionsgrenze des Virus bei Inkubation in Milzkulturen festlegen (geschätzte I. D. 50). Der Verdünnungseffekt allein erklärt aber nicht die Tatsache, daß das LDH-Virus so rasch seine Aktivität verloren hat, weil bei der Bestimmung der Infektiosität des LDH-Virus durch einfache geometrische Verdünnungsreihen ohne Einfluß der Gewebekultur noch eine Verdünnung von 8×10^3 im Tierversuch eine Erhöhung der Serum-LDH verursachte (siehe Teil Material und Methode).

Bei dieser Verdünnung war das Virus nach Inkubation auf Milzkulturen jedoch völlig inaktiv. Es ergibt sich somit die Überlegung, ob in unseren Milzkulturen eine Verdünnung bei gleichbleibender Aktivität oder ein Aktivitätsschwund des Virus zusätzlich zu seiner Verdünnung eintritt.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß 8 Tage lang die Infektiosität des LDH-Virus auf Milzkulturen erhalten bleibt und danach vollständig verschwindet. Aus unserer Versuchsanordnung läßt sich, wie ausführlich dargestellt, die Überlegung ableiten, daß die notwendige Erneuerung des Nährmediums der Milzkulturen die entscheidende quantitative Verdünnung der Virusmenge bedingt. Gleichzeitig bedeutet dies jedoch, daß eine Vermehrung von Viruspartikeln in den Milzzellen nicht stattfindet.

Eine weitere Erwägung betrifft die Infektiosität oder Aktivität des LDH-Virus in vitro, unabhängig von der oben angeschnittenen Frage seiner quantitativen Verminderung durch die Mediumerneuerung. Diese Fragen müssen auf Grund unserer Versuchsanordnung unbeantwortet bleiben, weil uns die näheren Kenntnisse über die Eigenschaften des LDH-Virus vorläufig noch fehlen.

Es ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das LDH-Virus während der Inkubation in Gewebekulturen seine LDH-erhöhende Eigenschaft verliert, ohne wirklich aufgelöst oder devitalisiert zu sein. Eine solche Überlegung wird durch die Untersuchungsergebnisse von RAUEN u. HUPE (23) angeregt, die zeigen konnten,

daß das LDH-Virus seine fermenterhöhende Wirkung bereits nach einem Tag verliert, wenn es von Mäusen auf Ratten übertragen wird.

5. VERGLEICH DER AUTOLYSE DES LDH-VIRUS IN VITRO MIT SEINER INKUBATION IN MÄUSEEMBRYONAL-KULTUREN (Versuch 107)

Es wurde untersucht, wie lange LDH-Virus aus Mäuseascitestumor Sa I seine fermenterhöhende Wirkung auf Mäuseembryonal-Kulturen (MEK) behält mit Virus verglichen, welches lediglich in Medium solcher Kulturen bzw. Hanks'scher Salzlösung inkubiert wurde. Die Ergebnisse dieses Versuches werden in den drei nebeneinander durchgeführten Experimenten besprochen.

Ergebnisse:

1. MEK wurden wie im Abschnitt Material und Methode dargestellt mit LDH-Virus aus Landschütz-Sarkom Sa I beimpft. Den Kulturen wurde fortlaufend Medium entnommen und an Mäusen versucht, das LDH-Virus wiederzufinden. Kulturmedien von infizierten MEK enthielten bis zu einer Inkubationszeit von 9 Tagen aktives LDH-Virus. Es ist zu bemerken, daß die Erhaltung des LDH-Virus nicht auf allen Kulturen bis zu diesem Zeitpunkt möglich war. Tabelle 3 zeigt, daß dieses unterschiedliche Verhalten besonders bei Kulturen beobachtet wurde, die mit Trypsin behandelt und umgesetzt worden waren. Hier gelang die aktive Erhaltung des Virus bis zu 12 Tagen. Um zu klären, ob ein Wechsel des Nährmediums einen Einfluß auf die Erhaltung des LDH-Virus in MEK ausübt, wurde ein solcher bei einer Kultur am 6. Tage nach Beginn der Inkubation durchgeführt. Nach dem Mediumwechsel konnte durch den Tierversuch kein LDH-Virus nachgewiesen werden.

Art der Inkubation des LDH-Virus in vitro	Inkubationsdauer	Verhalten der LDH-Er- höhung im Tierversuch	
1. MEK mit dem üblichen Nährmedium	8 Tage	negativ	
	9 Tage	positiv	
	MEK trypsiniert	9 Tage	negativ
	und umgesetzt	12 Tage	positiv
	MEK mit einmaligem	6 Tage	positiv
	Mediumwechsel	9 Tage	negativ
	nach 6 Tagen	12 Tage	negativ
	2. Nährmedium ohne Zellkultur	2 Tage	positiv
3 Tage		positiv	
4 Tage		(positiv)	
5 Tage		negativ	
8 Tage		negativ	
3. Hanks'sche Lösung ohne Zellkultur	2 Tage	positiv	
	4 Tage	positiv	
	5 Tage	negativ	

TABELLE 3: Nachweis des LDH-Virus durch seine LDH-erhöhende Wirkung im Tierversuch nach unterschiedlicher Art der Inkubation in vitro.

2. In zellfreiem Nährmedium, wie es für die Erhaltung von MEK verwendet wird, wurde das LDH-Virus wie auf Kulturen zugegeben und bei 37° in Vierkantflaschen inkubiert.

Danach begann die fermenterhöhende Wirkung des LDH-Virus bereits nach einer Zeit von 70 Stunden deutlich zu schwinden, wie die teils erhöhten, teils aber normalen Werte der Serum-LDH im Tierversuch zeigten. Nach 5-tägiger Inkubation wurden im Tierversuch durchwegs normale Werte beobachtet, was bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt in den Kulturmedien kein aktives LDH-Virus mehr enthalten war.

3. LDH-Virus wurde in Hanks'scher Salzlösung, die üblicherweise zu seiner Extraktion aus virusinfizierten tierischen Geweben verwendet wird, als zellfreie Viruslösung in gleicher Weise wie in den beiden vorhergegangenen Versuchen bei 37° inkubiert. Es zeigte sich, daß diese Lösung 4 Tage lang aktives LDH-Virus enthielt. Vom 5. Inkubationstag an konnte in der Gewebekultur kein LDH-Virus mehr nachgewiesen werden.

Diskussion:

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen der Inkubation des LDH-Virus auf Zellkulturen im Vergleich mit der Inkubation in reinem Kulturmedium oder Hanks'scher Salzlösung. Aus der Tatsache, daß das Virus auf Zellkulturen seine fermenterhöhende Wirkung ungefähr 5 Tage länger behält als in zellfreien Lösungen, läßt sich folgern, daß lebende Zellen die Erhaltung des wirksamen LDH-Virus beeinflussen.

Das Behandeln der MEK mit Trypsin verminderte die Erhaltung des Virus nicht. Lediglich nach einem Wechsel des Nährmediums trat ein Verlust des LDH-Virus in MEK auf. Die Ursache dieser Beobachtung ist aus der vorliegenden Versuchsanordnung nicht zu klären.

Unsere Versuche der Virusinkubation ohne Zellkulturen sind mit Untersuchungen von BAYERLE et al. (12), in denen LDH-Virus-haltiger Tumorigenascites der Autolyse überlassen wurde, vergleichbar. Dort wurde ein Verlust des Virus bereits nach 48-stündiger Inkubation beobachtet. Die Beobachtung, daß bei Inkubation in zellfreiem Sa I-Ascitestumorfiltrat das LDH-Virus länger, nämlich bis zu 4 Tagen aktiv erhalten werden kann, ließe sich durch die unterschiedliche Fermentausschaltung von Ascitestumor und zellfreiem Tumorfiltrat erklären. Die im Tumor vorhandenen autolytisch werdenden Zellen setzen wohl eine größere Zahl und Menge von Fermenten frei, die für das Virus abträglich sind, als es im zellfreien Filtrat möglich ist. Dadurch könnte erklärt werden, daß der Fermentschwund im Tumorigenascites rascher eintritt als in zellfreiem Tumorextrakt.

6. VERHALTEN DES LDH-VIRUS IN MÄUSEMBRYONALKULTUREN UNTER NÄHRMEDIEN UNTERSCHIEDLICHER ZUSAMMENSETZUNG (Versuch 126)

Im vorhergehenden Versuch wurde beobachtet, daß nach einem Wechsel des Nährmediums ein Schwund des LDH-Virus in MEK eintrat. Um der Ursache dieser Beobachtung näherzukommen und mögliche schädigende Faktoren für das Virus im Nährmedium zu ermitteln, wurden mehrere Experimente durchgeführt. Dabei wurde jeweils die Zusammensetzung der Nährmedien für die Gewebekulturen wesentlich verändert.

Ergebnisse:

1. Das LDH-Virus wurde in MEK mit der üblichen Zusammensetzung des Nährmediums von 1 Teil Hühnerembryonaleextrakt, 2 Teilen Kälberserum und 7 Teilen Hanks'scher Lösung inkubiert.

In diesen Kulturen behielt das LDH-Virus 8 Tage lang seine im Mäuseversuch nachweisbare fermentsteigernde Wirkung. Auch ein einmaliger Wechsel des

Nährmediums konnte anscheinend seine Aktivität nicht mindern.

2. Das LDH-Virus wurde in MEK gehalten, deren Nährmedium frei von Kälberserum war. In diesen MEK, deren Nährmedium von der üblichen Zusammensetzung abwich, konnte das Virus ebenfalls bis zu 8 Tagen aktiv erhalten werden.

Art der Inkubation des LDH-Agens	Inkubationszeit	Verhalten der LDH im Tierversuch
1. MEK mit dem üblichen Nährmedium	2 Tage	positiv
	4 Tage	positiv
	8 Tage	positiv
2. MEK mit Nährmedium ohne Kälberserum	2 Tage	positiv
	4 Tage	positiv
	8 Tage	positiv
3. MEK mit Nährmedium ohne Embryonalextrakt	8 Tage	positiv
4. MEK mit künstlichem Nährmedium TcM	8 Tage (ohne MW)	negativ
	8 Tage	positiv
5. Agens in Nährmedium ohne Zellkultur	2 Tage	positiv
	4 Tage	positiv
	8 Tage	negativ

TABELLE 4: Verhalten der Serum-LDH im Tierversuch nach Inkubation von LDH-Virus in Mäuseembryonalkulturen unter Nährmedien unterschiedlicher Zusammensetzung.

3. Das LDH-Virus wurde in MEK gegeben, deren Nährmedium keinen Hühnerembryonalextrakt enthielt. Auch hier behielt das LDH-Virus seine volle Wirksamkeit bis zu einer Inkubationszeit von 8 Tagen.
4. Inkubation von LDH-Virus in MEK mit dem künstlichen Nährmedium TCM, welches aus einem Gemisch von Aminosäuren, Zuckern und Vitaminen besteht (sog. Parker-Medium, Behring-Werke Marburg). Auffallenderweise verlor das LDH-Virus nur in der Kultur seine fermenterhöhende Wirkung, die mit dem künstlichen Medium TCM behandelt worden war

und 8 Tage lang unverändert im Inkubator belassen wurde. Auf einer mit dem gleichen Medium gefütterten Zellkultur, wo dieses während der Inkubation einmal gewechselt wurde, trat der Fermentschwund jedoch nicht ein.

5. Im Kontrollversuch wurde LDH-Virus in dem üblichen Nährmedium ohne Zellkultur inkubiert. Hier betrug die Überlebenszeit des LDH-Virus nur 4 Tage.

Diskussion:

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des früher besprochenen Versuches (107) kann aus den Ergebnissen des vorliegenden Versuches gefolgert werden, daß lebende Mäuseembryonalzellen auf das LDH-Virus eine lebensverlängernde Wirkung ausüben. Das LDH-Virus kann mit den üblichen Züchtungsmethoden in Fibroblastenkulturen ungefähr 8 Tage, in Ausnahmefällen etwas länger, erhalten werden. Die begrenzte Haltbarkeit des LDH-Virus in der Gewebekultur kann nicht durch biologische Faktoren bedingt sein, die in dem von uns verwendeten Nährmedium mit der Zusammensetzung aus Hühnerembryonalextrakt, Kälberserum und Hanks'scher Lösung enthalten sind. Das LDH-Virus bleibt ebenfalls 8 Tage lang erhalten, wenn im Nährmedium Hühnerembryonalextrakt oder Kälberserum nicht enthalten sind. Auch ein Wechsel des Nährmediums während der Inkubation vermag das LDH-Virus nicht zu schädigen. In Versuch 107 wurde zwar einmal der Schwund des Virus aus der Zellkultur bei einmaligem Mediumwechsel beobachtet, jedoch müssen für diesen Verlust des Virus andere schädigende Faktoren verantwortlich gewesen sein, da im vorliegenden Versuch (126) der Verlust des Virus nach Mediumwechsel in keiner der inkubierten Kulturen eintrat.

Ungünstig für die Erhaltung des LDH-Virus in MEK scheint die Anwendung von künstlichem Nährmedium TCM zu sein, besonders wenn das Nährmedium nicht gewechselt wird.

Der Kontrollversuch, in dem das LDH-Virus ohne Zellkulturen in Nährmedium inkubiert wurde, brachte ein bekanntes Ergebnis. Die Überlebenszeit des Virus betrug nur 4 Tage, also genau die Hälfte der Zeit, die das LDH-Virus auf Mäuseembryonalzellen wirksam geblieben war. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis von Versuch 107 überein. In Verbindung mit unseren Ergebnissen des vorhergegangenen Versuches 107 kann deshalb mit einiger Sicherheit gesagt werden, daß lebende Mäuseembryonalzellen in der Gewebekultur die Erhaltung des LDH-Virus begünstigen. Eine echte Neubildung von LDH-Virus, wie sie in vivo durch fortlaufende Mäusepassagen, besonders in den Untersuchungen von ZOBL (33) gezeigt wurde, ist in der Gewebekultur bei unserer Züchtungsmethode nicht möglich.

7. GEWEBEKULTUREN NACH DIAPLACENTARER INFEKTION VON MÄUSEEMBRYONEN MIT DEM LDH-VIRUS

A: VIRUSINJEKTION 24 STUNDEN VOR DER ENTNAHME DER EMBRYONEN (Versuch 95)

Weil der Versuch, das LDH-Virus in der Gewebekultur zu züchten, mit den bisher verwendeten Methoden mißlang, die Möglichkeit der unbegrenzten Vermehrung in vitro von YAFFE (32) sowie PLAGEMANN u. SWIM (22) aber angegeben wird, wurde nach einem geeigneteren Züchtungsverfahren gesucht. Es wurde dabei von der Beobachtung ausgegangen, daß bei einer mit dem LDH-Virus infizierten Maus alle Gewebe das Virus in aktiver Form enthalten. Daraus war zu folgern, daß auch Embryonen infizierter trächtiger Mäuse das LDH-Virus enthalten. Gemeinsam mit ZOBL versuchten wir zu zeigen, daß die diaplacentare Infektion von Embryonen mit dem LDH-Virus möglich ist.

Es sollte dabei auch eine bessere Adaptation des LDH-Virus an die für die Gewebekultur verwendeten Mäuseembryonalzellen ermöglicht werden, um damit eine Vermehrung in vitro zu erreichen.

Methode:

1. Trächtigen NMRI-Mäusen wurde einige Tage vor dem Wurf LDH-Virus aus Sarkom I in einer Impfdosis von 0,5 ml i. p. injiziert. Den Neugeborenen wurden 4 bis 6 Tage nach der Geburt Leber, Milz und Nieren entnommen. Aus diesen Organen wurde in üblicher Weise ein Filtrat hergestellt. Dieses Filtrat wurde neuen, ausgewachsenen NMRI-Mäusen injiziert und deren Serum-LDH mehrmals gemessen.
2. Einer trächtigen NMRI-Maus wurde 0,5 ml Sa I-Tumorfiltrat i. m. injiziert. 24 Stunden nach der Injektion wurde das Tier getötet. Die Embryonen wurden nun steril entnommen und in üblicher Weise zu MEK verarbeitet. Die Zellkulturen wurden mit dem gebräuchlichen Nährmedium beschickt und bei 37° inkubiert. Alle Kulturen zeigten 24 Stunden nach der Inkubation ein dichtes unauffälliges Wachstum.

A: Die Hälfte der Kulturen wurde unverändert inkubiert.

B: Die andere Hälfte der Kulturen wurde zusätzlich mit je 0,5 ml Sa I-Tumorfiltrat beimpft.

Vom Nährmedium aller Kulturen wurden zu verschiedenen Inkubationszeiten Proben für den Tierversuch entnommen.

Ergebnisse:

1) Mäuse, die ein Organfiltrat von neugeborenen Mäusen injiziert bekommen hatten, deren Muttertier ante partum mit dem LDH-Virus infiziert worden war, zeigten im Serum eine Erhöhung des LDH-Spiegels um das 6 bis 9-fache der Norm. Dieser durch das LDH-Virus bedingte Effekt blieb während der gesamten Versuchsdauer bestehen.

2a) Nach Infektion von Mäusen mit Nährmedien der Kulturen A blieben die Serum-LDH-Einheiten im Bereiche der Norm. Unwesentliche Abweichungen konnten auf anderweitige äußere Einwirkungen auf die Mäuse (bakterielle Infektion) zurückgeführt werden. Die Wiederholung des Versuches mit neuen Mäusen bestätigt dieses Ergebnis.

Wenn trächtige Mäuse 24 Stunden vor der Entnahme der Embryonen für die Gewebekultur mit dem LDH-Virus infiziert werden, ist also im Kulturmedium nach verschiedenen Inkubationszeiten kein aktives LDH-Virus enthalten.

b) Wurden die Kulturen zusätzlich mit dem LDH-Virus in vitro beimpft (B), dann enthielten alle Nährmedien in einem Zeitraum bis zu 8 Tagen das LDH-Virus in aktiver Form.

Im Tierversuch zeigte sich eine starke Erhöhung der Serum-LDH. Der Fermentpiegel war bereits am 2. Tag nach der Injektion 3 bis 4 mal höher als normal und stieg bis zum 8. Beobachtungstag laufend an. Eine längere Durchführung des Versuches war nicht möglich, da die Tiere wegen der häufigen Blutentnahme trotz i. p. Injektion von physiologischer Kochsalzlösung verendeten.

Bei Wiederholung des Versuches konnte die Serum-LDH der Mäuse bis zum Abbruch des Versuches am 34. Tage gemessen werden, weil die Blutentnahme für die Fermentbestimmung in größeren Zeitabständen erfolgte. Auch in diesem Wiederholungsversuch zeigten die Tiere eine starke Erhöhung des Serum-LDH-Spiegels.

Trotz unterschiedlich langer Inkubationszeiten des LDH-Virus in MEK konnte nach Injektion der Kulturmedien kein Unterschied in der Höhe des Fermentpiegels bei Mäusen beobachtet werden. Die Fermenterhöhung blieb während der gesamten Versuchsdauer gleich hoch. Ein weiterer Wiederholungsversuch bestätigt diese Befunde.

Diskussion:

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Infektion von neugeborenen Mäusen mit dem LDH-Virus durch das Muttertier erfolgt, da das LDH-Virus von diesen in Form eines Organfiltrats auf neue Mäuse übertragen werden kann und dort den typischen Anstieg des Fermentes LDH im Serum verursacht.

Aus der angegebenen Versuchsanordnung läßt sich aber nicht sagen, auf welchem Wege die Infektion der Neugeborenen erfolgt. NOTKINS u. SCHEELE (21)

sind der Ansicht, daß das LDH-Virus durch Schmierinfektion mit Speichel und Stuhl etc. oder durch die Muttermilch auf die neugeborenen Mäuse übertragen wird. Auch CRISPENS (8) gibt an, daß eine Infektion von neugeborenen Mäusen durch Kot und Urin möglich ist.

Es bleibt aber noch die bereits angeschnittene Frage offen, ob die Infektion der Embryonen diaplacental während der Tragzeit erfolgt. Diese Frage wird von CRISPENS (8) verneint.

Der Versuchsteil 2a) zeigte, daß Mäuseembryonen kein LDH-Virus enthalten, wenn die trächtigen Muttertiere im Abstand von nur 24 Stunden vor der Entnahme der Embryonen mit dem Virus infiziert werden. Daraus ergeben sich zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Einmal könnte die Zeitspanne zwischen der Virusinjektion in das Muttertier und der Entnahme der Embryonen zu kurz gewesen sein. Zum anderen könnte die Infektion der Mäuseembryonen wirklich auf einem anderen als dem diaplacentaren Wege erfolgen.

Diese Fragen müssen durch eine neue Versuchsanordnung mit einem längeren Intervall zwischen Virusbeimpfung und Entnahme der Embryonen geklärt werden.

Der Versuchsteil 2b) bestätigt lediglich die bei den früheren Versuchen (107 und 126) beschriebene Möglichkeit, das LDH-Virus ungefähr 8 Tage lang in Mäuseembryonalkulturen aktiv zu erhalten. Die Erhöhung der Serum-LDH-Werte im Tierversuch war hier mit Sicherheit nicht auf die Vorinjektion des Muttertieres, sondern auf die zusätzliche Beimpfung der Fibroblastenkulturen mit dem LDH-Virus zurückzuführen. Die offene Frage der diaplacentaren Virusübertragung wird im folgenden Abschnitt weiter besprochen.

Zeit zwischen Mäuseinfektion und Entnahme der Embryonen (in Stunden)	Inkubationszeiten in MEK (in Stunden)					Versuchs-Nr.
	72	96	120	192	240	
0	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	107
24	+	+	+	+	+	95
72	+	+	+	+	+	139
96	+	+	+	+	+	124

TABELLE 5: Der LDH-Effekt im Mäuseversuch nach Infektion mit in MEK inkubiertem LDH-Virus nach unterschiedlich langer Vorinjektionszeit.

B: VIRUSINJEKTION 96 STUNDEN VOR DER ENTNAHME DER EMBRYONEN (Versuch 124)

Es hatte sich im vorhergegangenen Versuch gezeigt, daß die diaplacentare Infektion von Mäuseembryonen mit dem LDH-Virus bei einer Vorinjektionszeit von 24 Stunden nicht möglich war. Um zu klären, ob eine diaplacentare Übertragung des LDH-Virus auf Mäuseembryonen möglich ist, wenn die Entnahme der Embryonen eine genügend lange Zeit nach der Infektion des Muttertieres erfolgt, wurde der Versuch bei gleicher Versuchsanordnung mit einer Vorinjektionszeit von 96 Stunden wiederholt.

Die Zeit von 96 Stunden wurde gewählt, da bei Infektion von Mäusen mit dem LDH-Virus in vivo der Beginn seiner fermentsteigernden Wirkung im Allgemeinen 4 Tage nach der Injektion eintritt.

Ergebnisse:

Nach der 96-stündigen Vorinfektion enthalten die aus diesen Embryonen hergestellten Gewebekulturen das Virus bis zu einer Inkubationsdauer von 240 Stunden. Injiziert man Mäusen die Medien von diesen Kulturen, so zeigen diese einen Anstieg der Serum-LDH, der das 5-fache der Norm beträgt. Dieser Fermentanstieg war nach 10-tägiger Inkubation des Virus noch genauso deutlich, wie nach 4-tägiger Inkubation. Bei zusätzlicher Beimpfung von Fibroblastenkulturen mit je 0,5 ml virushaltigem Filtrat aus Sarkom I trat der gleiche Fermentanstieg ein, wie bei nicht zusätzlich beimpften Kulturen. In allen Gewebekulturen wurde das Nährmedium mehrmals gewechselt. Eine Verdünnung der Virusmenge nach dem Mediumwechsel konnte nicht beobachtet werden.

Diskussion:

Die Ergebnisse zeigen, daß das LDH-Virus von infizierten trächtigen Mäusen durch die Placenta auf die Embryonen übertragen wird. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des vorhergegangenen Versuches 95 enthielten alle Kulturen das LDH-Virus. Das bedeutet, daß die Zeitspanne zwischen Virusinjektion in die trächtige Maus und der Entnahme der Embryonen mit 24 Stunden zu kurz war. Bei einem genügend lang gewählten Zeitraum wie beispielsweise von 96 Stunden war das Virus auf die Embryonen übergegangen.

Die Fibroblasten der bereits in utero infizierten Embryonen zeigten gegenüber den normalen Fibroblasten keine mikroskopisch faßbaren Unterschiede. Da das LDH-Virus bei dieser Versuchsanordnung 10 Tage lang in aktiver Form in der Gewebekultur erhalten bleibt, ergibt sich die Vermutung, daß sich das LDH-Virus bei diesem Infektionsweg besser an die Fibroblasten zu adaptieren scheint als bei einfacher Beimpfung normaler MEK.

Eine Verunreinigung etwa durch das virushaltige Blut der Muttertiere ist we-

gen der mehrmaligen Spülungen der durch Sectio cesaria entnommenen Foeten auszuschließen. Damit scheidet eine Kontaktinfektion durch das Muttertier aus, wie sie von NOTKINS und SCHEELE (21) sowie CRISPENS (81) für die Übertragung des LDH-Virus von Mäusen auf deren Nachkommen verantwortlich gemacht wird. Unsere Versuche beweisen erstmals eindeutig die Möglichkeit der diaplacentaren Übertragung des LDH-Virus (s. a. GEORGII, LENZ u. ZOBL, 1964, 16).

C: VIRUSINJEKTION 72 STUNDEN VOR DER ENTNAHME DER
EMBRYONEN UND LÄNGERE INKUBATIONSPERIODE IN DEN
EMBRYONALKULTUREN
(Versuch 139)

Es hatte sich in Versuch 124 gezeigt, daß nach Infektion von Mäuseembryonalzellen mit dem LDH-Virus in utero eine längere Überlebenszeit des Virus in der Gewebekultur beobachtet werden kann, als bei Beimpfung gewöhnlicher MEK. Es wurde nun versucht, das Virus auf den in utero infizierten Fibroblasten zu züchten, oder bei Mißlingen der Virusvermehrung die maximale Überlebenszeit in der Gewebekultur zu ermitteln.

Inkubationszeit	Versuchstage						
	4.	5.	7.	10.	12.	18.	26.
A: Nur vorinfizierte MEK							
168 h	230	175	124	165	161	173	204
240 h	207	239	163	229	177	246	176
336 h	202	152	197	188	210	230	270
384 h	196	199	159	185	197	183	238
480 h	40		27		38		
600 h	43		47		40		
672 h	51		61		29		
B: Zusätzlich infizierte Kulturen							
168 h	212	205	170	183	205	181	195
240 h	218	179	134	188	202	204	
336 h	126	156	77	222	166	186	188
384 h	93	151	75	135	156	174	198
480 h	29		23		33		
600 h	63		49		42		
672 h	62		62		39		

TABELLE 6: Mittelwerte der Serum-LDH-Einheiten an verschiedenen Versuchstagen nach Infektion von Mäusen mit dem LDH-Virus nach langfristiger Inkubation in vorinfizierten MEK.

Ergebnisse:

72 Stunden nach Beimpfen einer trächtigen Maus mit dem LDH-Virus wurden Kulturen aus den Embryonen angesetzt. 24 Stunden später wurde die Hälfte der Kulturen zusätzlich mit dem gleichen Virus beimpft, während die andere Hälfte ohne zusätzliche Beimpfung blieb. Die Kulturen konnten bis zu 42 Tagen in gutem Wachstum gehalten werden. Das Nährmedium üblicher Zusammensetzung wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Einige Kulturen wurden trypsiniert und zu Subkulturen geteilt.

Bis zu einer Inkubationsdauer von 16 Tagen enthielten die Kulturmedien sowohl der nur vorinfizierten, als auch der zusätzlich mit dem Virus beimpften Mäuseembryonalkulturen aktives LDH-Virus. Bei allen virusbeimpften Versuchstieren konnte eine auf das 3 bis 5-fache der Norm erhöhte Serum-LDH gemessen werden. Die Mittelwerte der Serum-LDH nach 16-tägiger Inkubation waren annähernd gleich hoch wie bei nur 7-tägiger Inkubation des LDH-Virus.

Nach Injektion von Medium aus Kulturen, die länger als 16 Tage inkubiert worden waren, blieb die Serum-LDH der Empfängermäuse im Bereiche der Norm. Es wurden hierbei die Medien von MEK im Tierversuch geprüft, bei welchen die Inkubation des Virus zwischen 20 und 28 Tagen lang dauerte. Im Wachstum der Zellen konnte ein Unterschied zwischen nur diaplacentar infizierten und zusätzlich in vitro infizierten Kulturen beobachtet werden. Erstere wuchsen während der ersten Tage in vitro besser als die zusätzlich infizierten.

Der LDH-Spiegel im Serum der Versuchstiere war bei den beiden Kulturgruppen annähernd gleich hoch. Der Abfall des Virusgehaltes in den Kulturen erfolgte ebenfalls nach der gleichen Inkubationszeit. Die trypsinierten und geteilten Kulturen verloren das LDH-Virus nach 16 Tagen, verhielten sich also genauso wie unbehandelte Primärkulturen.

Das Nährmedium zweier 16 Tage lang inkubierter MEK wurde durch geometrische Verdünnungsreihen getitert, um die Infektiosität des LDH-Virus nach langfristiger Inkubation zu bestimmen. Der infektiöse Titer nach 16-tägiger Inkubation betrug 10^{-1} gegenüber 10^{-4} der Ausgangslösung, d. h. des virushaltigen Filtrats aus Landschütz-Sarkom, das zur Beimpfung der Gewebekulturen verwendet wurde.

Durch das gesammelte Serum einer Gruppe von Versuchstieren, die mit Medium von 16 Tage lang inkubierten Kulturen injiziert worden waren, konnte das LDH-Virus auf neue Mäuse übertragen werden. In beiden durchgeführten Serumpassagen betrugen die durchschnittlichen Fermentwerte das 3 bis 5-fache der Norm. Unter gleichen Bedingungen mitgeführte Kontrolltiere hatten normale Serum-LDH-Werte.

Diskussion:

Durch Vorinjektion von LDH-Virus in trächtige Mäuse gelang es, die Embryonen in utero mit dem LDH-Virus zu infizieren. Eine Vorinjektionszeit von 24 Stunden erwies sich als zu kurz (Versuch 95). Unsere Versuchsergebnisse beweisen, daß die Adaptierung des LDH-Virus an Fibroblasten in vivo frühestens nach einer 72-stündigen Vorinjektionsspanne möglich ist (s. a. GEORGII u. BRDICZKA, 12; GEORGII, LENZ u. ZOBL, 16).

Die in vivo ausgeführte Infektion mit dem LDH-Virus verursacht bei den Mäuseembryonalzellen keine morphologisch faßbaren Schäden. Das LDH-Virus wird von den Zellen bis zu einer Inkubationszeit von 16 Tagen mit gleicher Intensität eliminiert. Nach dieser Zeit sinkt der Gehalt des LDH-Virus in den Kulturen sehr stark ab, was der niedrige Titer von nur 10^{-1} veranschaulicht und geht schließlich ganz verloren.

Der weitere Zusatz von LDH-Virus zu den bereits in vivo infizierten Kulturen bleibt wirkungslos.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen bekamen wir mit Zellkulturen, denen lediglich in vitro das Virus zugegeben wurde, etwas andere Werte. Bei diesem einfachen Zusatz blieb nur für 8 Tage aktives Virus in der Kultur enthalten. Es liegt nahe, die deutlich verlängerte Überlebenszeit von aktivem LDH-Virus nach diaplacentarer Infektion durch eine bessere Adaptation an die embryonale Gewebszelle zu erklären.

Bemerkenswert sind die unveränderten Wirkungen des inkubierten Virus auf den Fermentpiegel der Mäuse, der unabhängig von der Dauer der Inkubation gleich hoch war. Deshalb wurde der infektiöse Titer von unserer Ausgangsviruslösung mit demjenigen, der nach sehr langer Inkubation in Gewebekulturen vorlag, verglichen. Aus dem Abfall des infektiösen Titers um 3 Zehnerpotenzen folgt, daß in den zu verschiedenen Zeiten von den Kulturen entnommenen Medien quantitative Unterschiede an aktivem LDH-Virus bestehen. Daraus folgt einmal, daß sich die Zahl der Viruspartikel während der 16-tägigen Inkubation vermindert hat. Zum zweiten ergibt sich, daß unsere Fermentmessungen im Tierversuch keine quantitative Aussage hinsichtlich der injizierten Virusmenge darstellen, da wenige Tage nach der Injektion der Beginn der Virusvermehrung im Tier angenommen werden muß.

Damit zeigen die Versuchsergebnisse, (s. a. GEORGII u. LENZ, 15) daß eine Vermehrung des LDH-Virus in MEK nicht erfolgt, sondern durch die Technik der diaplacentaren Infektion in den später angelegten MEK lediglich ein verzögerter Abbau erreicht werden kann.

8. ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Das von RILEY beschriebene LDH-erhöhende Virus (Riley-Virus) ist in sehr vielen Transplantationstumoren der Maus enthalten (26). In diesen Untersuchungen gelang sein Nachweis auch im Mäuselymphom von NEMETH und KELLNER; durch Übertragung eines zellfreien Extraktes aus dem Tumor konnte bei Empfängermäusen ein über die gesamte Beobachtungszeit von 53 Tagen anhaltender Anstieg der Serum-LDH ausgelöst werden. Diese anhaltende Infektionswirkung des Virus nach zellfreier Übertragung wurde von RILEY et al. bereits 1960 angegeben (26). ADAMS et al. (1), GEORGII et al. (13) sowie MUNDY u. WILLIAMS (19) kamen unabhängig davon bei Untersuchung verschiedener Transplantationsgeschwülste der Maus zu dem gleichen Ergebnis.

Unsere Untersuchungsergebnisse führen zu der Frage, ob das LDH-Virus aus NK-Lymphom mit dem aus dem Mäuseascitestumor Sa I von LANDSCHÜTZ identisch ist, weil der Fermentanstieg nach zellfreier Übertragung von LDH-Virus aus NK-Lymphom rascher eintrat und bedeutend höhere Werte erreichte, als bei Übertragung von LDH-Virus aus Landschütz-Sarkom unter gleichen Versuchsbedingungen (s. a. GEORGII et al., 11).

Die Vermehrung von LDH-Virus in Gewebekulturen, wie sie von YAFFE (32) und PLAGEMANN u. SWIM (22) beschrieben wurde, ist in unseren Untersuchungen nicht gelungen. Auch in Milzkulturen blieb das LDH-Virus nur bis zu 8 Tagen erhalten, wobei weniger an einen eigentlichen Virusabbau als an einen Verdünnungseffekt durch die nötigen Mediuernerneuerungen zu denken ist. Eine Vermehrung des LDH-Virus findet jedenfalls auch in diesen Milzkulturen nicht statt.

Es wurde in unseren Experimenten nachgewiesen, daß lebende Zellen eine wesentliche Verlängerung der Erhaltens- oder Überlebenszeit des LDH-Virus bewirken (s. a. GEORGII et al., 12, 15 u. 16).

In autolytischem Tumorgewebe ging das Virus bedeutend schneller verloren als bei Haltung auf frischen Mäuse-Embryonal-Kulturen (BAYERLE et al., 2). Die Inkubation in physiologischen Lösungen ohne Zellkulturen bedeutet den Verlust der fermentbeeinflussenden Wirkung nach etwa 3 Tagen, während es in Mäuseembryonalkulturen bis zu 9 Tagen wirksam bleibt. Diese Ergebnisse zeigen, daß auch in MEK keine Vermehrung des Virus erfolgt. Auch ADAMS et al. (1), GEORGII u. BRDICZKA (12), ROWSON et al. (28) und TENNANT u. WARD (30) geben an, daß eine Vermehrung des LDH-Virus in Gewebekulturen nicht erfolgt.

Die Kulturmedien enthalten keine unmittelbar schädigenden Faktoren für das LDH-Virus, wie entsprechende Variationen unseres Versuchssystems zeigten. Auch die Erneuerung des Nährmediums konnte allein nicht für den Schwund des LDH-Virus aus den Kulturen verantwortlich gemacht werden.

Um eine bessere Adaptation des LDH-Virus an die für seine Vermehrung in vitro verwendeten Mäuseembryonalzellen zu erreichen, wurde das Embryonalgewe-

be diaplacental infiziert (s. a. GEORGII u. BRDICZKA, 12; GEORGII et al., 16). Bei den üblichen Methoden der Züchtung von Viren werden die fertigen Gewebekulturen mit dem Virus infiziert. Wir beimpften die trächtige Maus mit LDH-Virus, präparierten daraus virushaltige Kulturen und bewiesen damit gleichzeitig, daß im Gegensatz zu den Angaben von CRISPENS (8) und NOTKINS und SCHEELE (21) das LDH-Virus diaplacental 72 Stunden nach der Infektion des Muttertieres auf die Embryonen übertragen wird. Weiter gelingt es, bei derart vorinfizierten Zellkulturen, das LDH-Virus bis zu 16 Tagen (bei nicht vorinfizierten Kulturen nur bis zu 8 Tagen) zu erhalten. Das bedeutet, daß wir durch die von uns entwickelte Methode der diaplacentaren Infektion von Mäuseembryonalzellen die Überlebenszeit des LDH-Virus in vitro um das Doppelte verlängern konnten.

Trotz dieser nicht eindeutig gelungenen Züchtung des LDH-Virus in Gewebekulturen unterstreichen unsere Befunde die Virusnatur dieses fermenterhöhenden Faktors, der zunächst vorsichtig als virusartiges Agens bezeichnet wurde. Unsere eigenen Befunde mit dem LDH-Virus aus NEMETH-KELLNER-Mäuselymphom unterstreichen die Virusnatur von Riley-Agens. Im Zusammenhang mit dem elektronenmikroskopischen Nachweis durch BLADEN u. NOTKINS (3) und der korpuskulären Natur des LDH-Agens erscheint es deshalb gerechtfertigt, von fermentbeeinflussendem Virus zu sprechen. MAHY et al. (18), ROWSON et al. (28) sowie ADAMS et al. (1) nennen es nach seinem Entdecker einfach RILEY-Virus.

ADDENDUM

Die Durchführung der experimentellen Arbeiten im Tier-Laboratorium und im biochemischen Laboratorium wurde durch die Sachmittelbeihilfe und die Geräte der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht, die für das Forschungsvorhaben Ge 121/2 bzw. Ge 121/3 gewährt wurden.

Fräulein Gisela BACHL und Fräulein Edith HARDT wird für manche technische Mitarbeit bei diesen Untersuchungen gedankt.

Herrn Dr. A. GEORGII wird für die Anregung und Leitung der Arbeit gedankt.

SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

- 1) ADAMS, D.H., K.E.K. ROWSON and M.H. SALAMAN: The effect of tumors of leukaemia and of some viruses associated with them on the plasma lactic dehydrogenase activity of mice.
Brit. J. Cancer 15, 860 (1961).
- 2) BAYERLE, H., A. GEORGII u. P. JAKOB: Über das Verhalten des Lactat-dehydrogenase aktivierenden Virus aus Mäusegeschwülsten bei der Autolyse.
Z. Krebsforsch. 65, 171 (1962).
- 3) BLADEN jr., H.A. and A.L. NOTKINS: Electron microscopic demonstration of the lactic dehydrogenase agent.
Virology 21, 169 (1963).
- 4) BIERMANN, H.R., B. HILL, E. EMORY, L. REINHARDT and A. SAMUELS: Correlation of serum lactic dehydrogenase activity with clinical status of patients with neoplastic diseases.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2, 5 (1955).
- 5) BODANSKY, O.: Serum phosphohexose isomerase in cancer, as index of tumor growth in metastatic carcinoma of breast.
Cancer (Philadelphia), 7, 1200 (1954).
- 6) CHI-PING WU and JULI-LOW SUNG: Clinical study of lactic acid dehydrogenase.
Gastroenterology 42, 5 (1962).
- 7) CRISPENS, C.G.: Serum lactic dehydrogenase levels in mice during the development of autochthonous and chemically induced tumors.
J. nat. Cancer Inst. 30, 361 (1963).
- 8) CRISPENS, C.G.: On the epizootiology of the lactic dehydrogenase agent.
J. nat. Cancer Inst. 32, 497 (1964).
- 9) GEORGII, A.: Die Aktivitätsänderung der Lactatdehydrogenase im Serum nach Infektion mit Geschwulstvirus der Maus als Regulationsstörung in vivo.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 46, 357 (1962).
- 10) GEORGII, A.: Über das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus in Laboratoriumsgeschwülsten.
Klin. Wschr. 42, 559 (1964).
- 11) GEORGII, A., H. BAYERLE, D. BRDICZKA u. H. ZOBL: Über ein die Lactatdehydrogenase im Serum aktivierendes Virus aus Geschwülsten der Maus.
Z. Krebsforsch. 65, 334 (1963).

- 12) GEORGII, A. u. D. BRDICZKA: Die Überlebenszeit des Lactatdehydrogenase-agens aus Mäusegeschwülsten in Fibroblastenkulturen bei längerer Inkubation. *Z. Krebsforsch.* 66, 207 (1964).
- 13) GEORGII, A., M. JÄGER, H. KROTH u. H. BAYERLE: Aktivitätsänderungen der Lactatdehydrogenase im Mäuseplasma durch Beimpfung mit virushaltigen Gewebekulturen. *Experientia (Basel)*, 18, 71 (1962).
- 14) GEORGII, A., H. KROTH u. H. BAYERLE: Weitere Untersuchungen über die Aktivierung der Lactatdehydrogenase im Serum durch ein Geschwulstvirus der Maus. *Klin. Wschr.* 40, 363 (1962).
- 15) GEORGII, A. and I. LENZ: Failure to propagate a lactic dehydrogenase-elevating agent from mice tumors in mice embryo cultures. *Nature (Lond.)* 202, 1228 (1964).
- 16) GEORGII, A., I. LENZ and H. ZOBL: Penetration of the placental barrier by the lactate dehydrogenase-elevating virus (Riley) and its behavior in mouse embryo cultures following infection in utero. *Proc. Soc. exp. Biol.* 117, 322 (1964).
- 17) HILL, B.R. and C. LEVI: Elevation of a serum component in neoplastic diseases. *Cancer Res.* 14, 513 (1954).
- 18) MAHY, B.W., C.W. PARR and K.E.K. ROWSON: Increased plasma isomerase and transaminase activity in mice infected with lactic dehydrogenase-elevating virus. *Nature (Lond.)* 198, 885 (1963).
- 19) MUNDY, I. and P.C. WILLIAMS: Transmissible agent associated with some mouse neoplasm. *Science* 134, 134 (1961).
- 20) NOTKINS, A.L. and R.E. GREENFIELD: Infection of tumorbearing mice with the lactic-dehydrogenase agent. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*.
- 21) NOTKINS, A.L. and Ch. SCHEELE: Studies on the transmission and the excretion of the lactic dehydrogenase agent. *J. Exp. Med.* 111, 395 (1963).
- 22) PLAGEMANN, P.G.W. and H.E. SWIM: Studies of the plasma lactic-dehydrogenase-elevating virus of mice. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 4, 207 (1963).

- 23) RAUEN, H.M. u. H. HUPE: Das Lactatdehydrogenase-Agens im Blute tumortragender Mäuse.
Arzneimittel-Forsch. (Drug. Res.) 13, 1933 (1963).
- 23a) RILEY, V.: Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies.
Proc. Soc. exp. Biol. 104, 751 (1960).
- 24) RILEY, V.: Synergistic glycolytic activity associated with transmissible agents and neoplastic growth.
In: Control mechanism in respiration a. fermentation.
Bethesda: Ronald Press Co. 1963.
- 25) RILEY, V., E. HUERTO, J.D. LOVELESS, D. BARDELL and M. FITZ-MAURICE: Some characteristics of virus-like entities associated with thirty varieties of experimental tumors.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 261 (1961).
- 26) RILEY, V., F. LILLY, E. HUERTO and D. BARDELL: Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasm.
Science 132, 545 (1960).
- 27) RILEY, V. and F. WROBLEWSKI: Serial lactic dehydrogenase activity (LDH) in plasma of mice in growing or regressing tumors.
Science 132, 151 (1961).
- 28) ROWSON, K.E.K., D.H. ADAMS and M.H. SALAMAN: Riley's enzyme elevating virus: A study of the infection in mice and its relation to virus induced leukaemia.
VIII. Intern. Cancer Congr. Moscow 1962.
- 29) SCHWARTZ, M.A., M. WEST, W.S. WALSH and H. ZIMMERMANN: Serum enzymes in disease: VIII. Glycolytic and oxidative enzymes and transaminases in patients with gastrointestinal carcinoma.
Cancer (Philadelphia) 15, 146 (1962).
- 30) TENNANT, R.W. and T.G. WARD: Pneumonia-Virus of mice (PVM) in cell culture.
Proc. Soc. exp. Biol. 111, 395 (1962).
- 31) WARBURG, O., and W. CHRISTIAN: Gärungsfermente im Blutserum von Tumor-Ratten.
Biochem. Z. 314, 399 (1943).
- 32) YAFFE, D.: The distribution and in vitro propagation of an agent causing high plasma lactic dehydrogenase activity.
Cancer Res. 22, 573 (1962).

- 33) ZOBL, H. : Das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus aus Mäusegeschwülsten (Riley-Virus). I. Sein Vorkommen in einigen Geschwülsten und einige Eigenschaften bei seiner Übertragung.
Inaug.-Diss. München 1965.

LEBENS LAUF

Am 27.8.1939 wurde ich als Tochter des praktischen Arztes Dr. Anton Lenz und seiner Ehefrau Friederike, geb. Althanns, in Böhm.-Leipa/Sudetenland geboren.

Nach der Vertreibung im Jahre 1948 besuchte ich in Stassfurt/Sachsen-Anhalt die Volksschule und die Oberschule und bestand dort im Sommer 1957 die Reifeprüfung.

Da mir als Tochter eines Akademikers in der sog. DDR ein Hochschulstudium verweigert wurde, kam ich im Herbst 1957 nach München.

Nach einer Ergänzungsprüfung zur Reifeprüfung der SBZ studierte ich ein Semester Naturwissenschaften.

1958 begann ich das Studium der Medizin in München.

1959 bestand ich das Vorphysikum und 1961 das Physikum.

Nach 11 Studiensemestern legte ich im Sommer 1964 in München das medizinische Staatsexamen ab.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin in der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Bamberg tätig.

